

New peptides inhibit vascular endothelial cell growth factor

Patent number: DE19724793
Publication date: 1998-12-10
Inventor: GERMEROOTH LOTHAR DIPL CHEM DR (DE);
PIOSSEK CHRISTINE DIPL BIOL (DE); THIERAUCH
KARL-HEINZ DR (DE); SCHNEIDER-MERGENER
JENS DIPL C (DE)
Applicant: SCHERING AG (DE)
Classification:
- **international:** C07K7/08; C07K7/06; C07K14/00; A61K38/10;
A61K38/16; A61K38/08
- **europaean:** C07K14/71; C07K7/06B; C07K7/08B
Application number: DE19971024793 19970606
Priority number(s): DE19971024793 19970606

Abstract of DE19724793

Peptides of formula (I) in which at least one amino acid is a D-amino acid are new. $R_1-(X)_n-(Y)_m-(Lys)$
 $p-(Y)_m-(X)_n-(R_2)_r$ (I) R_1, R_2 = peptides with the sequence R_3-Z ; R_3 = peptide with the sequence Q; X,
Y = any L- or D-amino acids; Z = sequence of up to 12 amino acids; Q = sequence of 3-10 amino
acids; and n, m, p and r = 0 or 1.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY



⑮ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 197 24 793 A 1**

⑳ Aktenzeichen: 197 24 793.8
㉔ Anmeldetag: 6. 6. 97
㉕ Offenlegungstag: 10. 12. 98

㉙ Int. Cl.⁶:
C 07 K 7/08
C 07 K 7/06
C 07 K 14/00
A 61 K 38/10
A 61 K 38/16
A 61 K 38/08

DE 197 24 793 A 1

㉚ Anmelder:
Schering AG, 13353 Berlin, DE

㉛ Erfinder:
Piossek, Christine, Dipl.-Biol., 10965 Berlin, DE;
Germeroth, Lothar, Dipl.-Chem. Dr., 10717 Berlin,
DE; Schneider-Mergener, Jens, Dipl.-Chem. Dr.,
10717 Berlin, DE; Thierauch, Karl-Heinz, Dr., 14169
Berlin, DE

㉞ Entgegenhaltungen:
EP 55 113 A2
Patents Abstracts of Japan, C-374, September 24,
1986, Vol. 10/No. 280 zu JP 61-100597 A;
Patents Abstracts of Japan, C-255, December 6,
1984, Vol. 8/No. 266 zu JP 59-141546 A;

㉟ D-mutierte Peptide mit VEGF-Rezeptor blockierenden Eigenschaften
㊱ Es werden D-mutierte Peptide der allgemeinen Formel I



in der
R¹, R², X, Y, n, m, p und r die in der Beschreibung angege-
benen Bedeutungen haben, Verfahren zu deren Herstel-
lung und deren Verwendung zur Herstellung von Arznei-
mitteln zur Behandlung von verschiedenen Erkrankungen
beschrieben.

DE 197 24 793 A 1

Die Erfindung betrifft D-mutierte Peptide mit VEGF blockierenden Eigenschaften und deren Verwendung zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von verschiedenen Erkrankungen.

- 5 Persistente Angiogenese kann die Ursache für verschiedene Erkrankungen wie Psoriasis, Rheumatoide Arthritis, Hämangioma, Angiofibroma, Diabetische Retinopathie und Neovaskuläres Glaukom sein oder zu einer Verschlimmerung dieser Erkrankungen führen.

- Ein Inhibitor mit VEGF-Rezeptor-Blocker Eigenschaften kann zur Behandlung derartiger Erkrankungen und anderer VEGF-induzierter pathologischer Angiogenese und vaskularer permeabler Bedingungen, wie Tumor-Vaskularisierung, verwendet werden.

- 10 VEGF ist ein Wachstumsfaktor-Protein mit einer Größe von 42000 Dalton, das in fast allen Zellen unter hypoxischen Bedingungen hergestellt wird. Rezeptoren für diesen Faktor sind VEGFR1 und VEGFR2, die beide auf Endothelzellen bei der Wundheilung, bei Tumoren und während der Zellproliferation des Menstruationszyklus in Ovarien und im Uterus gefunden werden. Sie können nicht durch immunhistochemische Techniken auf ruhenden Endothelzellen festgestellt werden. Der Faktor induziert die Endothelzellproliferation und -migration.

Wachsende Tumoren benötigen ein sich ständig vergrößerndes Gefäßnetz, das es erlaubt, neu gebildete Tumorzellen mit ausreichender Nahrung zu versorgen. Es wurden Versuche mit VEGF-blockierenden Antikörpern an Tumor Nacktmäusen durchgeführt. Das Ergebnis war eine Unterbindung des Tumorwachstums.

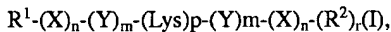
- Es ist bekannt, daß durch lösliche Rezeptoren und Antikörper gegen VEGF das Wachstum von Tumoren gehemmt werden kann.

In der WO 94/21679 sind vaskuläre endotheliale Zellwachstumsfaktor(VEGF)-Inhibitoren beschrieben, die natürlichen Ursprungs sind oder rekombinant hergestellte lösliche Formen darstellen. Es wird ferner beschrieben, daß die löslichen Formen des Rezeptors an den Wachstumsfaktor mit hoher Affinität binden und nicht zu Signaltransduktionen führen. Derartige lösliche Formen des Rezeptors binden VEGF und inhibieren seine Funktion.

- 25 Nachteile an den bekannten Inhibitoren ist, daß diese aus hochmolekularen Peptiden bestehen, deren Isolierung bzw. Herstellung, Charakterisierung und Reinigung mit großem Arbeitsaufwand verbunden ist. Ferner lassen sich derartige hochmolekulare Verbindungen in der Regel nicht ohne Probleme zu Medikamenten formulieren und anschließend als Medikament applizieren.

Ferner ist die Haltbarkeit derartiger Präparate geringer als bei niedermolekularen Peptiden.

- 30 Es wurden nun D-mutierte Peptide der allgemeinen Formel I



in der

- 35 R^1 und R^2 ein Peptid der Sequenz R^3-Z ,
 R^3 ein Peptid der Sequenz Q,
X und Y unabhängig voneinander eine beliebige L- oder D-Aminosäure,
Z für eine Peptid-Sequenz mit bis zu 12 Aminosäuren stehen kann die gleich oder verschieden sind und ein oder mehrfach enthalten sein können,
40 Q für eine Peptid-Sequenz mit 3–10 Aminosäuren, die gleich oder verschieden, ein oder mehrfach enthalten sein können wobei in der kompletten Peptidsequenz mindestens eine D-Aminosäure enthalten ist und
n, m, p und r unabhängig voneinander 0 oder 1 sind, gefunden, die gegenüber den bekannten Verbindungen bessere Eigenschaften aufweisen.

Bevorzugt sind solche Peptide der allgemeinen Formel I, in der

- 45 R^1 und R^2 ein Peptid der Sequenz R^3-Z ,
 R^3 ein Peptid der Sequenz Q,
X und Y unabhängig voneinander eine beliebige L- oder D-Aminosäure,
Z für eine Peptid-Sequenz mit bis zu 12 Aminosäuren stehen kann die gleich oder verschieden sind und ein oder mehrfach enthalten sein können und Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Met, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys,
50 Arg, His, Orn und Cit sind,
Q für eine Peptid-Sequenz mit 3–10 Aminosäuren, die gleich oder verschieden sind und ein oder mehrfach enthalten sein können und Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Met, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, His, Orn und Cit sind wobei in der kompletten Peptidsequenz mindestens eine D-Aminosäure enthalten ist und
n, m, p und r unabhängig voneinander 0 oder 1 sind.

- 55 Bevorzugt sind auch solche Peptide der allgemeinen Formel I, in der

- R^1 und R^2 ein Peptid der Sequenz R^3-Z ,
 R^3 ein Peptid der Sequenz Q,
X und Y unabhängig voneinander für Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Met, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, His, Orn und Cit, jeweils der L- oder D-Form stehen,
60 Z für eine Peptid-Sequenz mit bis zu 12 Aminosäuren stehen kann, die gleich oder verschieden sind und ein oder mehrfach enthalten sein können und Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Met, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, His, Orn und Cit sind,
Q für eine Peptid-Sequenz mit 3–10 Aminosäuren, die gleich oder verschieden sind und ein oder mehrfach enthalten sein können und Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Met, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, His, Orn und Cit sind wobei in der kompletten Peptidsequenz mindestens eine D-Aminosäure enthalten ist und
65 n, m, p und r unabhängig voneinander 0 oder 1 sind.

Besonders bevorzugt sind solche Peptide der allgemeinen Formel I, in der
 R^1 und R^2 ein Peptid der Sequenz R^3-Z ,

R^3 ein Peptid der Sequenz Q,
 X für Ala,
 Y für Ser,
 Z für eine Peptid-Sequenz mit bis zu 12 Aminosäuren stehen kann, die gleich oder verschieden sind und ein oder mehrfach enthalten sein können und Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Met, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, His, Orn und Cit sind, 5
 Q für eine Peptid-Sequenz mit 3–10 Aminosäuren, die gleich oder verschieden sind und ein oder mehrfach enthalten sein können und Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Met, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, His, Orn und Cit sind wobei in der kompletten Peptidsequenz mindestens eine D-Aminosäure enthalten ist und
 n, m, p und r unabhängig voneinander 0 oder 1 sind. 10
 Insbesondere bevorzugt sind solche Peptide der allgemeinen Formel I, in der
 R^1 und R^2 ein Peptid der Sequenz $R^3 - Z$,
 R^3 ein Peptid der Sequenz Q,
 X für Ala,
 Y für Ser, 15
 Z für eine Peptid-Sequenz mit bis zu 8 Aminosäuren stehen kann, die gleich oder verschieden sind und ein oder mehrfach enthalten sein können und Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Met, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, His, Orn und Cit sind,
 Q für eine Peptid-Sequenz mit 5–7 Aminosäuren, die gleich oder verschieden sind und ein oder mehrfach enthalten sein können und Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Met, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, His, Orn und Cit 20
 sind wobei in der kompletten Peptidsequenz mindestens eine D-Aminosäure enthalten ist und
 n, m, p und r unabhängig voneinander 0 oder 1 sind.
 Ganz besonders bevorzugt sind solche Peptide der allgemeinen Formel I, in der
 R^1 und R^2 ein Peptid der Sequenz R^3 -Ile-Asp-Phe-Asn-Trp-Glu-Tyr-Pro-, R^3 -Ser-Asp-Phe-Asn-Trp-Glu-Tyr-Pro-, R^3 -Ser-Asp-Phe-Asn-Trp-Glu-Thr-Pro-, R^3 -Ser-Asp-Phe-Asn-Trp-Asp-Thr-Pro-, R^3 -Ser-Asp-Phe-Gln-Trp-Asp-Thr-Pro-, 25
 R^3 -Phe-Asn-Trp-Glu-Tyr-Pro-, R^3 -Phe-Asn-Trp-Glu-Tyr-Asp-, R^3 -Phe-Asp-Trp-Glu-Tyr-Asp-, R^3 -Phe-Asp-Phe-Glu-Tyr-Asp-, R^3 -Tyr-Asp-Tyr-Asp-Tyr-Asp-, R^3 -Tyr-Asp-Tyr-Asp-Tyr-, R^3 -Tyr-Asp-Tyr-Asp-, R^3 -Tyr-Asp-Tyr-, R^3 -Tyr-Asp-, R^3 -Trp-Asp-Trp-Asp-Trp-Asp-, R^3 -Phe-Asp-Phe-Asp-Phe-Asp- oder R^3 -Tyr-Glu-Tyr-Glu-Tyr-Glu- ist und
 R^3 ein Peptid der Sequenz Glu-Leu-Asn-Val-Gly-Phe-Asp-, Asn-Leu-Asp-Val-Gly-Phe-Asp-, Asn-Leu-Asp-Ile-Gly-Phe-Asp-, Asp-Tyr-Asp-Tyr-Asp-Tyr-Asp-, Asp-Trp-Asp-Trp-Asp-Trp-Asp-, Asp-Phe-Asp-Phe-Asp-Phe-Asp-, Glu-Tyr-Glu-Tyr-Glu-Tyr-Glu- oder Glu-Phe-Ala-Tyr-Leu- ist und 30
 X Ala,
 Y Ser ist,
 wobei in der kompletten Peptidsequenz mindestens eine D-Aminosäure enthalten ist und 35
 n, m, p und r unabhängig voneinander 0 oder 1 sind.
 Unter den besonders bevorzugten Peptiden sind u. a. Peptide der allgemeinen Formel I mit der Sequenz

40

45

50

55

60

65

1. Glu-D-Phe-D-Ala-D-Tyr-D-Leu-Ile-Asp-Phe-Asn-Trp-Glu-Tyr-Pro-Ala-Ser-Lys,
- 5 2. Glu-D-Phe-D-Ala-D-Tyr-D-Leu-Ile-Asp-Phe-Asn-Trp-Glu-Tyr-Pro-Ala-Ser-Lys-
Ser-Ala-Pro-Tyr-Glu-Trp-Asn-Phe-Asp-Ile-D-Leu-D-Tyr-D-Ala-D-Phe-Glu,
- 10 3. Glu-D-Phe-D-Ala-D-Tyr-D-Leu-Ile-Asp-Phe-Asn-Trp-Glu-Tyr-Pro,
4. Glu-D-Phe-D-Ala-D-Tyr-D-Leu-D-Ser-Asp-Phe-Asn-Trp-Glu-Tyr-Pro,
- 15 5. Glu-D-Phe-D-Ala-D-Tyr-D-Leu-D-Ser-Asp-Phe-Asn-Trp-Glu-D-Thr-Pro,
6. Glu-D-Phe-D-Ala-D-Tyr-D-Leu-D-Ser-Asp-Phe-Asn-Trp-D-Asp-D-Thr-Pro,
- 20 7. Glu-D-Phe-D-Ala-D-Tyr-D-Leu-D-Ser-Asp-Phe-D-Gln-Trp-D-Asp-D-Thr-Pro,
8. Glu-Leu-Asn-Val-Gly-D-Phe-Asp-Phe-Asn-Trp-Glu-Tyr-Pro,
- 25 9. Glu-Leu-Asn-Val-Gly-D-Phe-Asp-Phe-Asn-Trp-Glu-Tyr-D-Asp,
10. Glu-Leu-Asn-Val-Gly-D-Phe-Asp-Phe-D-Asp-Trp-Glu-Tyr-D-Asp,
- 30 11. D-Asn-Leu-Asn-Val-Gly-D-Phe-Asp-Phe-D-Asp-Trp-Glu-Tyr-D-Asp,
- 35 12. D-Asn-Leu-D-Asp-Val-Gly-D-Phe-Asp-Phe-D-Asp-Trp-Glu-Tyr-D-Asp,
13. D-Asn-Leu-D-Asp-Val-Gly-D-Phe-Asp-Phe-D-Asp-D-Phe-Glu-Tyr-D-Asp,
- 40 14. D-Asn-Leu-D-Asp-D-Ile-Gly-D-Phe-Asp-Phe-D-Asp-D-Phe-Glu-Tyr-D-Asp,
15. D-Asn-Leu-D-Asp-D-Ile-Gly-D-Phe-D-Asp-Phe-D-Asp-D-Phe-Glu-Tyr-D-Asp,
- 45 16. D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-
D-Asp-D-Tyr-D-Asp,
- 50 17. D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-
Tyr,

55

60

65

18. D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp,
19. D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr, 5
20. D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp,
21. D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr, 10
22. D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp,
23. D-Asp-D-Trp-D-Asp-D-Trp-D-Asp-D-Trp-D-Asp-D-Trp-D-Asp-D-Trp-D-Asp-D- 15
Trp-D-Asp, 20
24. D-Asp-D-Phe-D-Asp-D-Phe-D-Asp-D-Phe-D-Asp-D-Phe-D-Asp-D-Phe-D-Asp-
D-Phe-D-Asp und 25
25. D-Glu-D-Tyr-D-Glu-D-Tyr-D-Glu-D-Tyr-D-Glu-D-Tyr-D-Glu-D-Tyr-D-Glu-D-Tyr-
D-Glu 30

gemeint.

Die erfindungsgemäßen Peptide kommen als pharmazeutische Wirkstoffe zur Anwendung und können alleine oder in Form einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die ein oder mehrere Verbindungen der allgemeinen Formel I enthält, zusammen mit pharmazeutisch geeigneten Lösungen, Trägern und Zusatzstoffen appliziert werden. 35

Die erfindungsgemäßen Peptide können alleine, als Gemisch oder als Zusammensetzung gemeinsam mit pharmazeutisch geeigneten Lösungen, Trägern und Zusatzstoffen enteral, parenteral, intravenös, subkutan, oral oder transdermal appliziert werden.

Die erfindungsgemäßen Peptide und deren Zusammensetzungen und Gemische können zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Erkrankungen wie Psoriasis, Kaposi-Sarkom, Blutgefäßwachstum in Gelenken und Knochen Rheumatoider Arthritis, Hämangioma, Angiofibroma, Diabetischer Retinopathie und Neovaskularem Glaukom und anderer VEGF-induzierter pathologischer Angiogenese, VEGF-bedingter Gefäßpermeabilisierung, Ödemen, Schlaganfall und vaskularer permeabler Bedingungen, wie Tumor-Vaskularisierung, verwendet werden. 40

Insbesondere können die erfindungsgemäßen Verbindungen zur Herstellung eines Arzneimittels zur Hemmung des Wachstums von Tumoren und Metastasen verwendet werden. 45

Die erfindungsgemäßen Verbindungen, deren Zusammensetzungen und Gemische, können auch zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von gynäkologischen Erkrankungen mit angiogenem Hintergrund wie Endometriose, Adenomyosis, Dysfunktionale Blutung des Uterus, Choriocarcinoma, Ektopische Schwangerschaft und Erkrankungen des Ovars verwendet werden.

Die erfindungsgemäßen Peptide können auch in Kombination mit lokal applizierbaren Gefäßwachstumsstimulatoren, wie VEGF, FGF, zur Anwendung kommen. 50

Die pharmazeutischen Wirkstoffe in ihrer Zusammensetzung bzw. ihren Gemischen sowie deren Verwendungen sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Geeignete Zusammensetzungen können nach an sich bekannten Verfahren hergestellt werden, wobei alle für eine Formulierung der Verbindungen der allgemeinen Formel I in der Pharmazie verwendbaren Lösungen, Träger und Zusatzstoffe zum Einsatz kommen können (Remington's Pharmaceutical Science, 15th Ed. Mack Publishing Company, East Pennsylvania, 1980). 55

Für den therapeutischen Einsatz kommen verschiedene Dosen der erfindungsgemäßen Peptide in Frage. So hängt die applizierbare Dosis von der jeweiligen Verbindung, dem Individuum, der Applikationsart (enteral, parenteral, intravenös, subkutan, oral, transdermal) und von der schwere der zu behandelnden Krankheit ab. 60

Beschreibung der Abkürzungen

Ala = Alanin
Val = Valin
Leu = Leucin
Ile = Isoleucin
Pro = Prolin

65

Phe = Phenylalanin

Trp = Tryptophan

Met = Methionin

Gly = Glycin

5 Ser = Serin

Thr = Threonin

Cys = Cystein

Tyr = Tyrosin

Asn = Asparagin

10 Gln = Glutamin

Asp = Asparaginsäure

Glu = Glutaminsäure

Lys = Lysin

Arg = Arginin

15 His = Histidin

Orn = Ornithin

Cit = Citrullin.

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Voruntersuchungen und die Herstellung der erfindungsgemäßen Peptide, ohne diese auf die Beispiele einzuschränken.

20

Beispiel 1

Synthese von Peptidbibliotheken

25 Zellulosegebundene und spaltbare Peptid-Sets wurden automatisch gegenüber Standardpunkt-Syntheseprotokollen (PepSpots, Jerini Bio Tools GmbH, Berlin, Deutschland) unter Verwendung eines Punktsynthetisierers (Abimed GmbH Langenfeld, Deutschland) hergestellt. Spaltbare Peptide wurden als Amide von dem Zelluloseträger unter Verwendung von Ammoniakdampf entfernt (Bray et al.). Anschließend wurden Filterscheiben mit adsorbierten Peptiden aus den Mikroplatten ausgestanzt. Nach der Desorption von der Zellulose-Matrix, unter Verwendung von Puffer, wurde die Peptid-

30 Lösung direkt für das Testsystem verwendet. Zur Generation der Sequenzfragmente wurde eine hierfür übliche Software verwendet.

Beispiel 6

35

Synthese der Peptide

Die erfindungsgemäßen Peptide wurden in mg-Mengen in einem Mehrfachpeptidsynthetisierer gemäß des Standard Fmoc Maschinenprotokolls (Abimed GmbH, Langenfeld, Deutschland), unter Verwendung von TentaGel S RAM Harz (50 mmol/g; Rapp Polymer, Tübingen, Deutschland) und PyBOP Aktivierung, hergestellt. Alle Peptide wurden mittels

40 HPLC auf einer reversed C18 Säule unter Verwendung eines 5% zu 60% Acetonitril/Wassergradienten (0,05% TFA) über einen Zeitraum von 20 Minuten analysiert, bei einer Flußgeschwindigkeit von 1,2 ml/min (Detektion bei 214 nm Wellenlänge) und mittels Laserdesorption in einem time-of-flight Massenspektrometer unter Verwendung von α -Cyano-4-hydroxy-zimtsäure als Matrix.

In analoger Verfahrensweise wurden folgende Peptide hergestellt:

45

1. Glu-D-Phe-D-Ala-D-Tyr-D-Leu-Ile-Asp-Phe-Asn-Trp-Glu-Tyr-Pro-Ala-Ser-Lys,

50

55

60

65

2. Glu-D-Phe-D-Ala-D-Tyr-D-Leu-Ile-Asp-Phe-Asn-Trp-Glu-Tyr-Pro-Ala-Ser-Lys-
Ser-Ala-Pro-Tyr-Glu-Trp-Asn-Phe-Asp-Ile-D-Leu-D-Tyr-D-Ala-D-Phe-Glu, 5
3. Glu-D-Phe-D-Ala-D-Tyr-D-Leu-Ile-Asp-Phe-Asn-Trp-Glu-Tyr-Pro,
4. Glu-D-Phe-D-Ala-D-Tyr-D-Leu-D-Ser-Asp-Phe-Asn-Trp-Glu-Tyr-Pro, 10
5. Glu-D-Phe-D-Ala-D-Tyr-D-Leu-D-Ser-Asp-Phe-Asn-Trp-Glu-D-Thr-Pro,
6. Glu-D-Phe-D-Ala-D-Tyr-D-Leu-D-Ser-Asp-Phe-Asn-Trp-D-Asp-D-Thr-Pro, 15
7. Glu-D-Phe-D-Ala-D-Tyr-D-Leu-D-Ser-Asp-Phe-D-Gln-Trp-D-Asp-D-Thr-Pro, 20
8. Glu-Leu-Asn-Val-Gly-D-Phe-Asp-Phe-Asn-Trp-Glu-Tyr-Pro,
9. Glu-Leu-Asn-Val-Gly-D-Phe-Asp-Phe-Asn-Trp-Glu-Tyr-D-Asp, 25
10. Glu-Leu-Asn-Val-Gly-D-Phe-Asp-Phe-D-Asp-Trp-Glu-Tyr-D-Asp,
11. D-Asn-Leu-Asp-Val-Gly-D-Phe-Asp-Phe-D-Asp-Trp-Glu-Tyr-D-Asp, 30
12. D-Asn-Leu-D-Asp-Val-Gly-D-Phe-Asp-Phe-D-Asp-Trp-Glu-Tyr-D-Asp,
13. D-Asn-Leu-D-Asp-Val-Gly-D-Phe-Asp-Phe-D-Asp-D-Phe-Glu-Tyr-D-Asp, 35
14. D-Asn-Leu-D-Asp-D-Ile-Gly-D-Phe-Asp-Phe-D-Asp-D-Phe-Glu-Tyr-D-Asp,
15. D-Asn-Leu-D-Asp-D-Ile-Gly-D-Phe-D-Asp-Phe-D-Asp-D-Phe-Glu-Tyr-D-Asp, 40
16. D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-
D-Asp-D-Tyr-D-Asp, 45
17. D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-
Tyr, 50
18. D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp,
19. D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr, 55
20. D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp,
21. D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr, 60
22. D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp,
23. D-Asp-D-Trp-D-Asp-D-Trp-D-Asp-D-Trp-D-Asp-D-Trp-D-Asp-D-Trp-D-Asp-D- 65

Trp-D-Asp,

5 24. D-Asp-D-Phe-D-Asp-D-Phe-D-Asp-D-Phe-D-Asp-D-Phe-D-Asp-D-Phe-D-Asp-D-Phe-D-Asp und

10 25. D-Glu-D-Tyr-D-Glu-D-Tyr-D-Glu-D-Tyr-D-Glu-D-Tyr-D-Glu-D-Tyr-D-Glu-D-Tyr-D-Glu
D-Glu

15 Die nachfolgenden Anwendungsbeispiele zeigen die Anwendung der erfindungsgemäßen Peptide ohne diese auf die Beispiele einzuschränken.

Anwendungsbeispiel 1

20 Menschliche Nabelschnurvenendothel-Zellkulturen

Menschliche Nabelschnüre werden mit konischen Vorrichtung kanüliert und mit sterilem PBS-Puffer gewaschen, der Kalzium, Magnesium und Penicillin/Streptomycin enthält um Blutzellen zu entfernen. Die Adern werden dann mit PBS-Puffer, der Chymotrypsin (0,1%) enthält, gefüllt und bei Raumtemperatur für 25 Minuten inkubiert. Nach leichter manueller Massage der Nabelschnüre wird die Zellsuspension in ein Gefäß gebracht, das 2 ml fötales Kälberserum enthält. Nach der Verdünnung mit Puffer werden die Zellen durch Zentrifugation gesammelt, einmal mit Puffer gewaschen und pro Nabelschnur in zwei 25 cm² Kulturflaschen ausgesät. Die Flaschen sind mit 10 µg/ml Kollagen, ggf. mit 1 µg/ml Fibronectin beschichtet. Die Kulturmedien enthalten M 199, 10% fötales Kälberserum (FCS), 10% Humanserum (HS), Glutamin oder Glutamax (2 mM), Penicillin (50 U/ml), Streptomycin (100 U/ml), Ascorbinsäure (0,00127 mM), Brenztraubensäure (1 mM) und 1% nichtessentielle Aminosäuren, 10 µg/ml Endothelialer-Zellwachstumsfaktor aus Rinderhirn und 7,5 µg/ml Heparin. 3 Stunden nach Ausplattierung werden die anhaftenden Zellen zweimal mit PBS-Puffer gewaschen, der Magnesium und Kalziumionen enthält. Danach werden die Zellen unter Standardbedingungen in dem oben beschriebenen Medium kultiviert. Anschließend werden die Zellen einer Trypsinverdauung ausgesetzt (0,02% Trypsin, 0,01% EDTA in phosphatgepufferter Salzlösung ohne bivalente Ionen), in Mikrotiterplatten mit einer Dichte von 1,6 × 10⁴ Zellen/Well ausgesät und anschließend 3 bis 7 Tage kultiviert.

Anwendungsbeispiel 2

Rezeptor Bindungs Assay (HUVEC-Bindung)

40 300 000 HUVEC wurden in jede Kavität einer 48-Kavitätenplatte ausgesät. Anschließend wurden die Zellen zwei Tage in einem Komplettmedium kultiviert und dann mit phosphatgepufferter Salzlösung gewaschen, die Kalzium- und Magnesiumchlorid enthält. Anschließend wurden bei 4°C 100 µl Medium M 199 ohne Zusätze, aber mit 0,1% Rinderse-
rumalbumin, hinzugefügt. Anschließend wurden jeweils 10 µl einer Lösung der erfindungsgemäßen Peptide hinzugefügt. Das Ganze wurde in DMSO gelöst und anschließend verdünnt. Danach wurden 40 µl 125I-VEGF hinzugefügt. Nach 2 Stunden Inkubationszeit bei 4°C wurde das Medium abgesaugt und 3mal mit 500 µl PBS gewaschen. Die Zellen wurden anschließend mit 100 µl 0,5% Natriumdodecylsulfat-Lösung unter gleichmäßigem Schütteln lysiert. Die Lösung wurde in ein Zählröhrchen zur Messung der γ -Strahlung gegeben. Das Resultat ergibt sich aus der Konzentration, die die spezifische Bindung zu 50% reduziert.

50 In der folgenden Tabelle I wird die Wirkung der erfindungsgemäßen D-mutierten Peptide als VEGF-Blocker gezeigt.

55

60

65

Peptid	IC ₅₀ (nM)	
Nr. 1		5
Glu-D-Phe-D-Ala-D-Tyr-D-Leu-Ile-Asp- Phe- Asn-Trp-Glu-Tyr-Pro-Ala-Ser- <u>Lys</u>	300	10
Nr. 2		15
Glu-D-Phe-D-Ala-D-Tyr-D-Leu-Ile-Asp-Phe- Asn-Trp-Glu-Tyr-Pro-Ala-Ser- <u>Lys</u> -Ser-Ala- Pro-Tyr-Glu-Trp-Asn-Phe-Asp-Ile-D-Leu-D- Tyr-D-Ala-D-Phe-Glu	30	20
Nr. 3		25
Glu-D-Phe-D-Ala-D-Tyr-D-Leu-Ile-Asp-Phe- Asn-Trp-Glu-Tyr-Pro	80	30
		35

Anwendungsbeispiel 3

Festphasen Bindungs Assay

Peptidbibliotheken, die kovalent an Zellulosefilterpapier gebunden sind, wurden in TRIS-Cl gepufferter Salzlösung, 45
 enthaltend 0,05% Tween 20 (TBS/Tween), inkubiert. Nach zwei Waschungen mit Puffer wurde das Papier durch Inku-
 bation über 60 Minuten bei 4°C in TBS/Tween, enthaltend 5% Milchpulver, gestoppt. Zu dieser Lösung wurde 125I-
 VEGF hinzugefügt, bis zu einer Konzentration von 0,1 mCi/ml. Die Inkubation wurde fünf Minuten lang fortgesetzt, be-
 vor die Zellulosebibliotheken in drei Bädern, enthaltend TBS/Tween, gewaschen wurden. Über Nacht wurden die Zellu-
 loseblätter auf einen Autoradiographiefilm gelegt und einwirken gelassen. Anschließend wurde der Film entwickelt. Bin- 50
 dungspeptide werden als starke schwarze Punkte detektiert.

Anwendungsbeispiel 4

Rezeptor Autophosphorylierung

100 000 HUVEC wurden in 12 Wellplatten plattiert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen auf Eis gelegt und frisches 55
 Medium wurde hinzugefügt, mit der Lösungsmittel-Kontrolle, VEGF oder VEGF plus Peptide in eiskaltem Medium
 M199, mit 0,1% BSA. Die Inkubation wurde für 1 Stunde fortgesetzt. Anschließend wurde das Medium entfernt und eis-
 kalter RIPA-Puffer (50 mM HEPES pH 7,2, 10 mM EDTA; 0,1% SDS; 1% NP-40; 0,5% Deoxycholat; 50 mM Na-Pyro- 60
 phosphat; 100 mM NaF; 2 mM ortho-Vanadat; 1 mM Zinkacetat; 1,25 mM PMSF; 10 µg/ml Aprotinin) hinzugefügt. Die
 DNA wurde über eine Millipore-Filtration entfernt (0,65 mM). 50 µl Weizenkeimagglutinin-Sepharose wurde anschlie-
 ßend zu dem Filtrat hinzugefügt und das Gemisch wurde unter einstündigem Rollen bei 4°C inkubiert. Die Sepharose
 wurde durch Zentrifugation getrennt, der Überstand wurde verworfen und 25 µl eines zweifach konzentrierten SDS-
 Elektrophorese-Puffers gemäß Laemmli wurde hinzugefügt und für 5 Minuten gekocht. Proteine wurden auf einem 65
 6%igen SDS-Gel gemäß ihrer Größe getrennt. Die Proteine wurden auf eine PVDF-Membran durch halbtrockenes Elek-
 troblotting übertragen. Die Membran wurde mit 0,25% Tween in PBS, der Magnesium- und Kalziumchlorid enthält, ab-
 gebrochen. Nach drei 15-minütigen Waschen mit 0,05% Tween im gleichen Puffer wurden Meerrettich- gekoppelte-An-

tiphosphotyrosinmonoklonalen Antikörper in einer Konzentration von 1 : 1000, die einer Konzentration von 250 ng/ml entspricht (nochmals in 0,05% Tween enthaltenden Puffer), hinzugefügt. Nach jeweils drei 1 5-minütigen Wäschen wurde der Blot mit einem Verstärkerchemolumineszenz-System entwickelt.

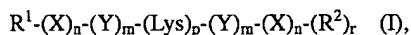
Die Ergebnisse der Untersuchung sind in der folgenden Tabelle II aufgeführt.

Hemmung der VEGFR II Rezeptor Autophosphorylierung

Peptid	IC ₅₀ (nM)
Nr. 1 Glu-D-Phe-D-Ala-D-Tyr-D-Leu-Ile-Asp-Phe- Asn-Trp-Glu-Tyr-Pro-Ala-Ser-Lys	3000
Nr. 2 Glu-D-Phe-D-Ala-D-Tyr-D-Leu-Ile-Asp-Phe- Asn-Trp-Glu-Tyr-Pro-Ala-Ser-Lys-Ser-Ala- Pro-Tyr-Glu-Trp-Asn-Phe-Asp-Ile-D-Leu-D- Tyr-D-Ala-D-Phe-Glu	500
Nr. 3 Glu-D-Phe-D-Ala-D-Tyr-D-Leu-Ile-Asp-Phe- Asn-Trp-Glu-Tyr-Pro	300

Patentansprüche

1. D-mutierte Peptide der allgemeinen Formel I



in der

R¹ und R² ein Peptid der Sequenz R³-Z,

R³ ein Peptid der Sequenz Q,

X und Y unabhängig voneinander eine beliebige L- oder D-Aminosäure,

Z für eine Peptid-Sequenz mit bis zu 12 Aminosäuren stehen kann, die gleich oder verschieden sind und ein oder mehrfach enthalten sein können,

Q für eine Peptid-Sequenz mit 3–10 Aminosäuren, die gleich oder verschieden, ein oder mehrfach enthalten sein können, wobei in der kompletten Peptidsequenz mindestens eine D-Aminosäure enthalten ist und

n, m, p und r unabhängig voneinander 0 oder 1 sind.

2. Peptide der allgemeinen Formel I, gemäß Anspruch 1, in der

R¹ und R² ein Peptid der Sequenz R³-Z,

R³ ein Peptid der Sequenz Q,

X und Y unabhängig voneinander eine beliebige L- oder D-Aminosäure,

Z für eine Peptid-Sequenz mit bis zu 12 Aminosäuren, die gleich oder verschieden sind und ein oder mehrfach enthalten sein können und Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Met, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, His, Orn und Cit sind,

Q für eine Peptid-Sequenz mit 3–10 Aminosäuren, die gleich oder verschieden sind und ein oder mehrfach enthalten sein können und Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Met, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, His, Orn und Cit sind,

wobei in der kompletten Peptidsequenz mindestens eine D-Aminosäure enthalten ist und

n, m, p und r unabhängig voneinander 0 oder 1 sind.

3. Peptide der allgemeinen Formel I, gemäß den Ansprüchen 1 und 2, in der

R¹ und R² ein Peptid der Sequenz R³-Z,

R³ ein Peptid der Sequenz Q,

X und Y unabhängig voneinander für Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Met, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, His, Orn und Cit, jeweils in der L- oder D-Form stehen,

Z für eine Peptid-Sequenz mit bis zu 12 Aminosäuren stehen kann, die gleich oder verschieden sind und ein oder mehrfach enthalten sein können und Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Met, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, His, Orn und Cit sind,

Q für eine Peptid-Sequenz mit 3–10 Aminosäuren, die gleich oder verschieden sind und ein oder mehrfach enthalten sein können und Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Met, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, His, Orn und Cit sind,

wobei in der kompletten Peptidsequenz mindestens eine D-Aminosäure enthalten ist und

n, m, p und r unabhängig voneinander 0 oder 1 sind.

4. Peptide der allgemeinen Formel I, gemäß den Ansprüchen 1–3, in der

R¹ und R² ein Peptid der Sequenz R³-Z,

R³ ein Peptid der Sequenz Q,

X für Ala,

Y für Ser,

Z für eine Peptid-Sequenz mit bis zu 12 Aminosäuren stehen kann, die gleich oder verschieden sind und ein oder mehrfach enthalten sein können und Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Met, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, His, Orn und Cit sind,

Q für eine Peptid-Sequenz mit 3–10 Aminosäuren, die gleich oder verschieden sind und ein oder mehrfach enthalten sein können und Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Met, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, His, Orn und Cit sind,

wobei in der kompletten Peptidsequenz mindestens eine D-Aminosäure enthalten ist und

n, m, p und r unabhängig voneinander 0 oder 1 sind.

5. Peptide der allgemeinen Formel I, gemäß den Ansprüchen 1–4, in der

R¹ und R² ein Peptid der Sequenz R³-Z,

R³ ein Peptid der Sequenz Q,

X für Ala,

Y für Ser,

Z für eine Peptid-Sequenz mit bis zu 8 Aminosäuren stehen kann, die gleich oder verschieden sind und ein oder mehrfach enthalten sein können und Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Met, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, His, Orn und Cit sind,

Q für eine Peptid-Sequenz mit 5–7 Aminosäuren, die gleich oder verschieden sind und ein oder mehrfach enthalten sein können und Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Met, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, His, Orn und Cit sind,

wobei in der kompletten Peptidsequenz mindestens eine D-Aminosäure enthalten ist und

n, m, p und r unabhängig voneinander 0 oder 1 sind.

6. Peptide der allgemeinen Formel I, gemäß den Ansprüchen 1–5, in der

R¹ und R² ein Peptid der Sequenz

R³-Ile-Asp-Phe-Asn-Trp-Glu-Tyr-Pro-, R³-Ser-Asp-Phe-Asn-Trp-Glu-Tyr-Pro- R³-Ser-Asp-Phe-Asn-Trp-Glu-Thr-Pro-, R³-Ser-Asp-Phe-Asn-Trp-Asp-Thr-Pro-, R³-Ser-Asp-Phe-Gln-Trp-Asp-Thr-Pro-, R³-Phe-Asn-Trp-Glu-Tyr-Pro-, R³-Phe-Asn-Trp-Glu-Tyr-Asp-, R³-Phe-Asp-Trp-Glu-Tyr-Asp-, R³-Phe-Asp-Phe-Glu-Tyr-Asp-, R³-Tyr-Asp-Tyr-Asp-Tyr-Asp-, R³-Tyr-Asp-Tyr-Asp-Tyr-, R³-Tyr-Asp-Tyr-Asp-, R³-Tyr-Asp-Tyr-, R³-Tyr-Asp-, R³-Tyr-, R³-Trp-Asp-Trp-Asp-Trp-Asp-, R³-Phe-Asp-Phe-Asp-Phe-Asp oder R³-Tyr-Glu-Tyr-Glu-Tyr-Glu- ist und R³ ein Peptid der Sequenz Glu-Leu-Asn-Val-Gly-Phe-Asp-, Asn-Leu-Asp-Val-Gly-Phe-Asp-, Asn-Leu-Asp-Ile-Gly-Phe-Asp-, Asp-Tyr-Asp-Tyr-Asp-Tyr-Asp-, Asp-Trp-Asp-Trp-Asp-Trp-Asp-, Asp-Phe-Asp-Phe-Asp-Phe-Asp-, Glu-Tyr-Glu-Tyr-Glu-Tyr-Glu- oder Glu-Phe-Ala-Tyr-Leu- ist und

X Ala,

Y Ser ist,

wobei in der kompletten Peptidsequenz mindestens eine D-Aminosäure enthalten ist und

n, m, p und r unabhängig voneinander 0 oder 1 sind.

7. Peptide der allgemeinen Formel I, gemäß den Ansprüchen 1–6, mit der Sequenz

1. Glu-D-Phe-D-Ala-D-Tyr-D-Leu-Ile-Asp-Phe-Asn-Trp-Glu-Tyr-Pro-Ala-Ser-
5 Lys,
2. Glu-D-Phe-D-Ala-D-Tyr-D-Leu-Ile-Asp-Phe-Asn-Trp-Glu-Tyr-Pro-Ala-Ser-
10 Lys-Ser-Ala-Pro-Tyr-Glu-Trp-Asn-Phe-Asp-Ile-D-Leu-D-Tyr-D-Ala-D-Phe-
Glu,
- 15 3. Glu-D-Phe-D-Ala-D-Tyr-D-Leu-Ile-Asp-Phe-Asn-Trp-Glu-Tyr-Pro,
4. Glu-D-Phe-D-Ala-D-Tyr-D-Leu-D-Ser-Asp-Phe-Asn-Trp-Glu-Tyr-Pro,
- 20 5. Glu-D-Phe-D-Ala-D-Tyr-D-Leu-D-Ser-Asp-Phe-Asn-Trp-Glu-D-Thr-Pro,
6. Glu-D-Phe-D-Ala-D-Tyr-D-Leu-D-Ser-Asp-Phe-Asn-Trp-D-Asp-D-Thr-Pro,
- 25 7. Glu-D-Phe-D-Ala-D-Tyr-D-Leu-D-Ser-Asp-Phe-D-Gln-Trp-D-Asp-D-Thr-
30 Pro,

8. Glu-Leu-Asn-Val-Gly-D-Phe-Asp-Phe-Asn-Trp-Glu-Tyr-Pro,
9. Glu-Leu-Asn-Val-Gly-D-Phe-Asp-Phe-Asn-Trp-Glu-Tyr-D-Asp, 5
10. Glu-Leu-Asn-Val-Gly-D-Phe-Asp-Phe-D-Asp-Trp-Glu-Tyr-D-Asp,
11. D-Asn-Leu-Asp-Val-Gly-D-Phe-Asp-Phe-D-Asp-Trp-Glu-Tyr-D-Asp, 10
12. D-Asn-Leu-D-Asp-Val-Gly-D-Phe-Asp-Phe-D-Asp-Trp-Glu-Tyr-D-Asp,
13. D-Asn-Leu-D-Asp-Val-Gly-D-Phe-Asp-Phe-D-Asp-D-Phe-Glu-Tyr-D-Asp, 15
14. D-Asn-Leu-D-Asp-D-Ile-Gly-D-Phe-Asp-Phe-D-Asp-D-Phe-Glu-Tyr-D-Asp, 20
15. D-Asn-Leu-D-Asp-D-Ile-Gly-D-Phe-D-Asp-Phe-D-Asp-D-Phe-Glu-Tyr-D-Asp, 25
16. D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp, 30
17. D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr, 35
18. D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp, 40
19. D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr, 45
20. D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp, 50
21. D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr, 55
22. D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp-D-Tyr-D-Asp, 60
23. D-Asp-D-Trp-D-Asp-D-Trp-D-Asp-D-Trp-D-Asp-D-Trp-D-Asp-D-Trp-D-Asp-D-Trp-D-Asp, 65
24. D-Asp-D-Phe-D-Asp-D-Phe-D-Asp-D-Phe-D-Asp-D-Phe-D-Asp-D-Phe-D-Asp-D-Phe-D-Asp und
25. D-Glu-D-Tyr-D-Glu-D-Tyr-D-Glu-D-Tyr-D-Glu-D-Tyr-D-Glu-D-Tyr-D-Glu-D-Tyr-D-Glu.

8. Peptide der allgemeinen Formel I, nach einem der Ansprüche 1–7, als pharmazeutische Wirkstoffe.

9. Eine pharmazeutische Zusammensetzung, die ein oder mehrere Peptide der allgemeinen Formel I, gemäß den

Ansprüchen 1–7, zusammen mit pharmazeutisch geeigneten Lösungen, Trägern und Zusatzstoffen enthält.

10. Eine enteral, parenteral, intravenös, subkutan, oral oder transdermal applizierbare Zusammensetzung, die ein oder mehrere Peptide der allgemeinen Formel I, gemäß den Ansprüchen 1–7, zusammen mit pharmazeutisch geeigneten Lösungen, Trägern und Zusatzstoffen enthält.

5 11. Verwendung der Peptide gemäß den Ansprüchen 1–7 und deren Zusammensetzungen gemäß den Ansprüchen 9 und 10 oder deren Gemische, zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Psoriasis, Kaposi-Sarkom, Blutgefäßwachstum in Gelenken und Knochen, Rheumatoider Arthritis, Hämangioma, Angiofibroma, Diabetischer Retinopathie und Neovaskularem Glaukom.

10 12. Verwendung der Peptide gemäß den Ansprüchen 1–7 und deren Zusammensetzungen gemäß den Ansprüchen 9 und 10 oder deren Gemische, zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von VEGF-induzierter pathologischer Angiogenese, VEGF-bedingter Gefäßpermeabilisierung, Ödemen und Schlaganfall.

13. Verwendung der Peptide gemäß den Ansprüchen 1–7 und deren Zusammensetzungen gemäß den Ansprüchen 9 und 10 oder deren Gemische, zur Herstellung eines Arzneimittels zur Hemmung des Wachstums von Tumoren und Metastasen.

15 14. Verwendung der Peptide gemäß den Ansprüchen 1–7 und deren Zusammensetzungen gemäß den Ansprüchen 9 und 10 oder deren Gemische, zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von gynäkologischen Erkrankungen mit angiogenem Hintergrund wie Endometriose, Adenomyosis, Dysfunktionale Blutung des Uterus, Choriocarcinoma, Ektopische Schwangerschaft und Erkrankungen des Ovars.

20 15. Verwendung der Peptide gemäß den Ansprüchen 1–7 und deren Zusammensetzungen gemäß den Ansprüchen 9 und 10 oder deren Gemische, in Kombination mit lokal applizierbaren Gefäßwachstumsstimulatoren.

16. Verwendung der Peptide gemäß Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß der Gefäßwachstumsstimulator VEGF und FGF ist.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.